

# Evaluation of the primary mouse hepatocyte model for the prediction of genotoxicity

Citation for published version (APA):

Mathijs, K. (2009). *Evaluation of the primary mouse hepatocyte model for the prediction of genotoxicity*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht.  
<https://doi.org/10.26481/dis.20091209km>

## Document status and date:

Published: 01/01/2009

## DOI:

[10.26481/dis.20091209km](https://doi.org/10.26481/dis.20091209km)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

# **Nederlandse Samenvatting**

Het onderzoek, beschreven in deze thesis, is voornamelijk gericht op het ontwikkelen van alternatieven voor dierproeven op gebied van genotoxiciteitstesten met behulp van toxicogenomics. Het voornaamste doel was het identificeren van een set merkers die een effect hebben op de genexpressie en die in staat zijn verbindingen te toetsen op hun genotoxisch vermogen in een relevant *in vitro* model. Daarnaast werd de genexpressie data gebruikt om de onderliggende moleculaire mechanismen, die gepaard gaan met chemische carcinogenese, te bestuderen.

*In vitro* levermodellen worden frequent gebruikt in toxicologische studies omdat de lever een belangrijke rol speelt in het metabolisme van vele verbindingen en omdat, in systemische toxiciteit, de lever een belangrijk doel-orgaan is (1, 2). Levercellijnen, primaire hepatocyten culturen en lever coupes van verschillende diersoorten zijn goed ingeburgerd als *in vitro* systemen voor dergelijke studies (1, 2, 3). Aangezien lever coupes een zeer korte levensduur hebben en cellijnen een groot deel van de leverspecifieke functies verloren hebben worden primaire hepatocyt culturen bij voorkeur gebruikt voor *in vitro* studies op gebied van lever toxiciteit (3, 4, 5). Primaire hepatocyten culturen van de mens en rat zijn veelgebruikte *in vitro* systemen in toxicologische studies. Primaire hepatocyten culturen van de muis zijn echter minder goed beschreven, maar muizen modellen worden steeds belangrijker in de toxicologie omdat transgene muizen modellen de mogelijkheid geven om de mechanismen van toxiciteit te bestuderen. Bovendien is leverkanker de meest voorkomende kanker in muizen. Om deze redenen werden, in dit onderzoek, primaire muizen hepatocyten onderzocht.

Als strategie om de mogelijke kankerverwekkende eigenschappen van chemische verbindingen te identificeren werd een gedifferentieerde aanpak gebruikt. Ten eerste werden *in vitro* en, indien noodzakelijk, *in vivo* genotoxiciteitstesten uitgevoerd, gevolgd door carcinogeniciteitstesten in dieren. De klassieke 2 jaar durende knaagdier bioassay, gebruikt om chemische stoffen te beoordelen op hun carcinogeen vermogen, is erg duur en tijdrovend omwille van het gebruik van een groot aantal dieren en grote hoeveelheden van de teststof en heeft daarnaast ook een aantal ethische bezwaren. Bovendien wordt de betrouwbaarheid, de relevantie en de doeltreffendheid van deze *in vivo* testen onderworpen aan tal van onzekerheden met betrekking tot de risico- extrapolatie van dier naar mens. Daarom wordt het gebruik van *in vitro* modellen voor het voorspellen van de *in vivo* carcinogeniciteit bij de mens steeds meer overwogen (6). Eerdere *in vitro* systemen die gebruikt werden voor de identificatie van het genotoxische, en dus mogelijk kankerverwekkend vermogen van chemische stoffen, zijn de bacteriële Ames test, de muislymfom test, de micronucleus test en de chromosoom aberratie test (7). Deze systemen hebben het voordeel relatief eenvoudig en goedkoop te zijn. Een belangrijk nadeel van deze *in vitro* genotoxiciteitstesten zijn echter de van extreem veel vals-positieven die uit deze test komen ten opzichte van de *in vivo* genotoxiciteit en carci-

nogeniteit resultaten (7). Dit vraagt om betere *in vitro* testen voor het voorspellen van genotoxiciteit en carcinogeniteit die minder valse positieven voortbrengen.

Genomics-technologieën zijn in staat de functie van het complete genoom te onderzoeken met behulp van expressie analyses op het niveau van transcriptie (transcriptomics), translatie (proteomics) en metabolisme (metabonomics). De combinatie van deze technologieën met de benodigde bio-informatica hulpmiddelen, zal leiden tot een revolutie in de huidige risico- en gevaren-evaluatie.

Hypothetisch gezien zal de toxicogenomica leiden tot de identificatie van zogeheten “fingerprints”, een reeks van genexpressie-effect merkers die in staat zijn om verbindingen te testen op hun carcinogeen vermogen. Deze genexpressie “fingerprints” zouden negatief moeten zijn voor niet-kankerverwekkende stoffen en positief moeten zijn voor de chemische kankerverwekkende stoffen, terwijl ze in staat moeten zijn een onderscheid te maken tussen de GTX en NGTX carcinogenen en tussen echte en valse positieve GTX verbindingen. Bovendien zouden ze zeer vergelijkbaar moeten zijn tussen het proefdier model en de mens.

Uiteindelijk zou dit kunnen leiden tot de ontwikkeling van een voorspellende high-throughput test die meer specifiek, toegewijd, goedkoper en sociaal meer aanvaardbaar is dan de momenteel beschikbare diersmodellen en die, bovendien, gebruikt kan worden in procedures voor chemische veiligheid als een alternatief voor de huidige testen in knaagdieren.

Het doel van dit proefschrift is het evalueren en optimaliseren van het gebruik van *in vitro* primaire hepatocyt culturen van de muis om sets van genexpressie-effect merkers te identificeren die in staat zijn onderscheid te maken tussen echte en valse positieve genotoxische kankerverwekkende stoffen.

## HepG2 studie

Om de optimale tijdstippen voor profilering van genexpressie in cellen *in vitro* te bepalen werden eerst tijdsafhankelijke veranderingen in de cellulaire respons na blootstelling aan een bekend carcinogeen onderzocht, met de bedoeling om dit verder toe te passen in de primaire muizen hepatocyten (8, 9). Het is reeds in ons laboratorium aangetoond dat genexpressie-profielen gebruikt kunnen worden om genotoxische van niet-genotoxische carcinogenen te dicrimineren (10). Tijdsafhankelijke effecten werden echter nog niet onderzocht en daarom werden de eerste experimenten uitgevoerd in de menselijke hepaatoom (HepG2) cellen, beschreven in **Hoofdstuk 2**. De veranderingen in de genexpressie-profielen van HepG2-cellen, veroorzaakt door het model carcinogeen Benzo(a)pyreen (BaP), werden, met betrekking tot DNA-adduct niveaus en celcyclus distributie, onderzocht op 12 tijdstippen na de blootstelling.

In deze gedetailleerde tijdsreeks studie werden, na blootstelling van de cellen aan de kankerverwekkende stof BaP, talrijke tijdelijke veranderingen in genenclusters waargenomen. Dit levert daarmee een ongekend inzicht in de tijdsafhankelijke interacties van de betrokken processen en pathways. De meest interessante effecten werden waargenomen met betrekking tot DNA-herstel. Zowel base excisie herstel als globaal genomisch herstel correleerde met DNA-adducten en werden veroorzaakt vanaf 9/12 u tot 60 u, wanneer de adducten nog steeds aanwezig zijn.

De resultaten van deze studie suggereren bovendien ook dat wanneer de celniveaus in de G1-fase laag zijn en DNA adduct niveaus hoog zijn, het metabolisme van de cellen voornamelijk gericht is op die van de nucleotiden, terwijl het metabolisme van aminozuren en lipiden omlaag gereguleerd is. Zodra de celcyclus distributie weer normaal is en de meeste DNA-adducten hersteld zijn, keren de metabole processen terug tot het controle niveau. Bovendien zijn verscheidene reactie pathways in genexpressie, transcriptie en translatie in opeenvolgende perioden omhoog gereguleerd.

Al deze waarnemingen wijzen erop dat de cellulaire transcriptoom strikt gereguleerd is en dat het zich aanpast aan de veranderende behoeften van de cellen na acute blootstelling aan een carcinogeen. Tijdsafhankelijke effecten van BaP op genexpressie-profielen werden waargenomen, waaruit blijkt dat er verschillende tijdstippen moeten worden geëvalueerd op genexpressie-profilering in de volgende studies met primaire muis hepatocyten.

### **Hepatocyt-gebaseerd muizen *in vitro* model**

Tot nu toe werden de primaire muizen hepatocyten niet vaak gebruikt in de toxicologie. Daarom werd het potentiële nut van een *in vitro* muizen hepatocyten model voor toxicologie beoordeeld door de tijdsafhankelijke bevoegdheid tot het metabolisme van xenobiotica en de stabiliteit van genexpressie-profielen te onderzoeken in **Hoofdstuk 3**. Genexpressie-profielen bleken zeer verschillend zijn tussen de drie geanalyseerde tijdstippen (0, 42 en 90 uur). Deze tijdsafhankelijke veranderingen kunnen worden toegeschreven aan de aanpassing van de primaire hepatocyten aan hun *in vitro* omgeving. Maar de genexpressie-profielen van de replica's echter, bleken zeer vergelijkbaar te zijn per tijdstip, ondanks dat er, onmiddellijk na de isolatie van de cellen, grotere verschillen tussen de dieren werden waargenomen. Dit kan worden veroorzaakt door variatie in de initiële stress veroorzaakt door de enzymatische scheiding en isolatie van hepatocyten (11). Deze inter-dier variabiliteit is minder duidelijk in de latere tijdstippen, wat aangeeft dat de stress responsen vervagen.

Pathway analyse, gebruikt voor de identificatie van de biochemische pathways en biologische processen die differentieel tot expressie werden gebracht, onthulde initiële effecten op het niveau van de externe signalerings pathways en energieproductie genen-

sets. Latere effecten werden waargenomen voor genensets die verband houden met transcriptie, translatie en membraan- en celcyclus-gerelateerde effecten. Het algemene beeld op basis van deze pathway analyses, was dat de leverspecifieke functies continu afnamen en dat, in het algemeen, cellulaire organisaties voortdurend omhoog gereguleerd werden.

Om de metabole bevoegdheid van sandwich-gekweekte muizen hepatocyten meer in detail te onderzoeken, werden genexpressie-profielen van fase I en fase II biotransformatie-enzymen geëvalueerd tijdens de kweekperiode. In het algemeen nemen de expressiewaarden van alle fase I biotransformatie-enzymen af gedurende de gehele kweekperiode. Ook de enzym-activiteiten van de meeste Cyp450 enzymen nemen af gedurende de gehele tijdsperiode, alleen Cyp2B9-10/13/19/23 vertoonde een toename van de activiteit en expressie niveaus. Na 90 uur in kweek bleken alle Cyp450 enzymen nog steeds actief in de primaire hepatocyten. De meeste Cyp450s bleken in conventionele sandwich-gekweekte ratten hepatocyten zeer snel te verminderen, zelfs binnen de korte periode van 24 uur na isolatie (12, 13). Terwijl in onze studie de genexpressie-niveaus een tragere afname in de tijd vertoonde, wat aangeeft dat de muizen hepatocyten meer stabiel blijven op gebied van Cyp450 genexpressie ten opzichte van ratten hepatocyten, maar niet ten opzichte van menselijke hepatocyten.

De genexpressie van fase II enzymen was, op het einde, slechts afgenomen tot 92% van de oorspronkelijke niveaus. Dit is in overeenstemming met verschillende studies bij ratten die suggereren dat, in kweek, fase II enzym-activiteiten beter bewaard worden dan fase I enzym-activiteiten (14, 15).

Een globale vergelijking van de genexpressie-niveaus van fase I en fase II enzymen van hepatocyten van ratten en muizen heeft aangetoond dat de muizen hepatocyten een stabiel genexpressie-patroon vertonen dan de primaire ratten hepatocyten.

Al deze resultaten geven aan dat het in sandwich-gekweekte primaire muizen hepatocyten *in vitro* systeem weinig of geen inter-dier variaties heeft, wat de reproduceerbaarheid aantoont. Er werd aangetoond dat het systeem robuust is en dat het de metabole bevoegdheid beter lijkt te behouden ten opzichte van ratten hepatocyten. Op basis van onze genexpressie gegevens, adviseren wij een herstel periode van 42 u toe te passen alvorens de muizen hepatocyten te gebruiken om stress responsen, veroorzaakt door de perfusie-methode, te verminderen.

Vervolgens wordt in **Hoofdstuk 4** het primaire muizen hepatocyt model verder gekarakteriseerd door de evaluatie van genexpressie-profielen na blootstelling aan een model carcinogeen, namelijk BaP. Omdat we, in **Hoofdstuk 2**, waargenomen hebben dat de tijd een grote invloed heeft op genexpressie-profielen in HepG2 cellen na blootstelling aan BaP, werden tijdsafhankelijke effecten op DNA schade en verandering in genexpressie-profielen ten gevolge van BaP in primaire muizen hepatocyten onderzocht. Ook de dosis-afhankelijke effecten werden onderzocht in dit model. Daarvoor werden de hepatocyten, na een herstel periode van 42 uur, zoals aanbevolen in **Hoofdstuk 3**, gedu-

rende verschillende tijdsperioden behandeld met verschillende niet-toxische concentraties van BaP.

Uit genexpressie analyse bleek dat de primaire muizen hepatocyten duidelijke tijds- en dosis-afhankelijke effecten, geïnduceerd door blootstelling aan BaP, vertonen. Tijdsafhankelijke effecten van BaP bleken belangrijker te zijn vergeleken met de dosisafhankelijke effecten. Deze tijdseffecten, echter, waren zeer verschillend van die beschreven in **Hoofdstuk 2**, aangezien een continue omhoog-of omlaag-regulatie werd waargenomen in de primaire muizen hepatocyten, terwijl meer variatie werd waargenomen in HepG2 cellen. Aangezien BaP gekend is voor het veroorzaken van een halt in de celcyclus in delende cellen, om beschadigd DNA te repareren, is het niet verwonderlijk dat de effecten van BaP verschillen tussen delende cellen, zoals HepG2 cellen, en niet-delende cellen, zoals primaire muizen hepatocyten (8, 16, 17, 18).

Om de relevantie van het primaire muizen *in vitro* systeem verder te bepalen, werden genexpressie resultaten vergeleken met een muizen *in vivo* studie die genomische responsen aan BaP in de lever beoordeelde. Enkele gelijkenissen tussen deze twee systemen werden aangetoond. Maar, in de primaire hepatocyten, echter, werden meer genen differentieel tot expressie gebracht en werden meer gemoduleerde groepen genen gevonden. Toch moet worden opgemerkt dat de gebruikte doses en dosering regimes in beide modellen, niet vergelijkbaar zijn, aangezien enkel één hoge dosis *in vitro* en meerdere lage dosissen *in vivo* gebruikt werden.

Ook de effecten van BaP op DNA-schade, als marker van genotoxische effecten, werden in primaire muizen hepatocyten bestudeerd in **Hoofdstuk 4**. De kleuring van  $\gamma$ H2AX foci werd gebruikt om dubbel streng DNA (dsDNA) breuken op te sporen en DNA werd geïsoleerd om BaP-DNA-adducten te bepalen. Zowel DNA-adducten en dsDNA breuken bleken tijds- en dosis-afhankelijk toe te nemen. Deze tijds- en dosis-afhankelijke invloed werd ook waargenomen in de analyse van genexpressie. De resultaten in **Hoofdstuk 4** tonen aan dat de primaire muizen hepatocyten in staat zijn om gevoelig te reageren op blootstelling aan BaP: ze zijn in staat om BaP te metaboliseren, wat DNA-adducten en goed gekarakteriseerde veranderingen in genexpressie-profielen veroorzaakt.

### Klasse discriminatie

Omdat het onderzoek beschreven in de vorige hoofdstukken aangetoond heeft dat primaire muizen hepatocyten robuust zijn, in staat zijn de metabole bevoegdheid te handhaven gedurende de hele kweekperiode en in staat zijn te reageren zoals verwacht na blootstelling aan een bekende genotoxische kankerverwekkende stof, onderzochten we, in **Hoofdstuk 5**, de bevoegdheid van de primaire muizen hepatocyten om genotoxische (GTX) kankerverwekkende stoffen van niet-genotoxische (NGTX) carcinogenen te

onderscheiden. Omdat de duur van blootstelling een grote invloed heeft op genexpressie-profielen, zoals aangetoond in **Hoofdstuk 2** en **Hoofdstuk 4**, werd verondersteld dat de blootstellingsperiode ook van invloed zou kunnen zijn op klasse discriminatie gebaseerd op transcriptomics gegevens. Primaire muizen hepatocyten werden derhalve geanalyseerd op verschillende tijdstippen na blootstelling aan twee GTX en twee NGTX kankerverwekkende stoffen. Discriminatie van GTX en NGTX verbindingen op basis van genexpressie-profielen, werd uitgevoerd door de 'Prediction Analysis of Microarray' software (PAM), waarbij een 'supervised clustering' methode toegepast wordt. In de studie beschreven in **Hoofdstuk 5** blijkt klasse discriminatie inderdaad afhankelijk te zijn van de blootstellingstijd. Het gebruik van PAM resulteerde enkel in een succesvolle klasse discriminatie op de latere tijdstippen, terwijl na 12 uur van de behandeling de verbindingen onjuist geclassificeerd werden. De zogenaamde 'classifiers', gegenereerd door PAM, werden vergeleken met elkaar en de 'classifiers' die na 36 uur van de blootstelling verkregen werden bleken veel overlap te vertonen met die van 24 of 48 uur. Daarom werden alleen deze twee tijdstippen onderzocht in een validatie studie met twee extra GTX verbindingen. Op basis van hun genexpressie-profielen werden beide verbindingen correct geclassificeerd als GTX, waaruit blijkt dat de verkregen 'classifiers' na blootstelling aan kankerverwekkende stoffen inderdaad in staat zijn onderscheid te maken tussen de GTX en NGTX klassen.

Immunokleuring van  $\gamma$ H2AX foci werd gebruikt om fenotypisch DNA-schade te controleren. De  $\gamma$ H2AX test bevestigde significante inductie van schade door de behandeling met GTX verbindingen, terwijl NGTX verbindingen niet in staat waren om schade te induceren.

De studie beschreven in **Hoofdstuk 5** toonde aan dat genexpressie-profilering in de primaire muizen hepatocyten het potentieel heeft om de GTX van de NGTX verbindingen te onderscheiden en dat de classificatie verbeterde met toenemende behandelings-tijd.

In **Hoofdstuk 6** hebben we vervolgens onderzocht of een primaire muizen hepatocyten *in vitro* systeem in staat is onderscheid te maken tussen GTX verbindingen en vals-positieve GTX verbindingen met behulp van een toxicogenomics aanpak. De vals-positieve GTX verbindingen, gekozen voor deze studie, worden beschouwd als niet-kankerverwekkende stoffen die slechts genotoxiciteit vertonen in *in vitro* testen, maar niet *in vivo*.

Omdat we in **Hoofdstuk 5** vonden dat 24 en 48 uur de optimale tijdstippen zijn voor klasse discriminatie werden primaire muizen hepatocyten gedurende 24 en 48 uur behandeld met vijf echte GTX en vijf vals-positieve GTX verbindingen. Clustering van veranderingen in genexpressie, veroorzaakt door echte en vals-positieve GTX verbindingen, met behulp van HCA, bleek een veel betere clustering op te leveren na 48 uur vergeleken met 24 uur, waaruit blijkt dat 48 uur meer optimaal is voor de indeling van waar en vals-positieve GTX verbindingen.



Na de toepassing van PAM voor elk geanalyseerd tijdstip voor de veranderingen in genexpressie, konden ‘classifiers’ geselecteerd worden wat resulteerde in een juiste indeling voor 9 verbindingen op beide tijdstippen. Enkel 2-Acetylaminofluorene (2-AAF) werd ten onrechte aangezien voor een vals-positieve GTX compound. Dit kan worden verklaard door de specifieke genexpressie-profielen van genen die betrokken zijn bij apoptose en celcyclus. Deze genen worden gewoonlijk gestimuleerd door DNA-schade veroorzaakt door GTX verbindingen (19, 20) en worden omgekeerd tot expressie gebracht na behandeling met 2-AAF in vergelijking met de andere echte GTX verbindingen. En omdat deze genen betrokken zijn bij de indeling van de GTX verbindingen, wordt 2-AAF wellicht onjuist geclassificeerd op basis van genexpressie-profielen.

De ‘classifiers’ verkregen uit PAM lijken een betrouwbaar onderscheid te maken tussen echte en vals-positieve GTX verbindingen, zowel op 24 en 48 uur. Beide tijdstippen zijn in dit geval optimaal voor de indeling van echte en vals-positieve GTX verbindingen.

In een poging om fenotypisch een onderscheid te maken tussen echte en vals-positieve GTX verbindingen werden de verschillen in  $\gamma$ H2AX foci vorming ook geëvalueerd in **Hoofdstuk 6**. Alle echte GTX verbindingen waren significant in staat om  $\gamma$ H2AX foci te vormen op beide tijdstippen en enkel één vals-positieve GTX verbinding, namelijk 4-NP, leek  $\gamma$ H2AX foci te kunnen vormen.

Alleen in de cellen die behandeld werden met BaP werd een significante invloed van de tijd waargenomen, waaruit nogmaals blijkt dat beide tijdstippen optimaal kunnen zijn voor de discriminatie van de echte GTX verbindingen van de vals-positieve GTX verbindingen.

De studie beschreven in **Hoofdstuk 6** laat zien dat, afhankelijk van de gebruikte methode, echte GTX carcinogenen redelijk goed onderscheiden kunnen worden van vals-positieve GTX verbindingen in primaire muizen hepatocyten door genexpressie-profilering. De meest succesvolle discriminatie werd met behulp van PAM verkregen. Hoewel de discriminatie niet perfect is, kan genexpressie-profilering in primaire muizen hepatocyten dienen als een nieuw *in vitro* systeem met de capaciteit om echte GTX van vals-positieve GTX verbindingen te onderscheiden.

De toepassing van klasse discriminatie van GTX verbindingen met genexpressie-profilering werd al eerder aangetoond in verschillende *in vivo* en *in vitro* studies (7, 10, 21-37). Vergeleken met de vaak gebruikte chronische knaagdier bioassays, is het gebruik van primaire muizen hepatocyten voor de screening van de genotoxische effecten van chemische verbindingen duidelijk een verbetering omdat het veel minder dieren vergt en minder tijdrovend is. Vergeleken met een aantal gerenommeerde *in vitro* systemen, zoals de Ames-test, de muis lymfoomtest, de micronucleus test en de chromosoom aberratie test, kan het primaire muizen hepatocyten model een lager percentage vals positieve teweegbrengen aangezien alle vals-positieve GTX verbindingen, gebruikt in dit onderzoek, genotoxiciteit vertoonde in een aantal goed gevestigde *in vitro* syste-

men die vaak gebruikt worden om het kankerverwekkende potentieel van verbindingen te identificeren, maar in primaire muizen hepatocyten duidelijk apart van de echte GTX kankerverwekkende stoffen ingedeeld werden. Daarom kan dit model de basis vormen voor de ontwikkeling van een voorspellende test, die als alternatief voor de huidige knaagdier genotoxiciteit testen kan worden toegepast in chemische veiligheidstesten. In combinatie met fenotypische verankering kan dit model leiden tot het gebruik van een specifiek *in vitro* systeem dat specifieke *in vivo* toxiciteit kan voorspellen.

## Beperkingen en aanbevelingen

Het primaire muizen *in vitro* model dat gebruikt werd in dit onderzoek heeft een aantal beperkingen met betrekking tot het gebruik ervan voor de beoordeling van de genotoxische effecten van chemische verbindingen.

De isolatie van de primaire muizen hepatocyten met behulp van de twee-stap collagenase perfusie is een technisch ingewikkelde procedure en vereist enige oefening. De hepatocyten moeten vers uit het dier verkregen worden om hun leverspecifieke functies te behouden. Lange-termijn culturen van functionele hepatocyten zijn moeilijk te behouden, maar in een sandwich-configuratie kunnen hepatocyten voor een langere periode gekweekt worden (38, 39).

Bovendien is het muizen hepatocyt model dat gebruikt werd in dit onderzoek slechts berust op één lever-cel type, namelijk hepatocyten, terwijl andere lever cellen afwezig zijn. Vergelijking met de *in vivo* situatie kan ook beperkt zijn, omdat in het muizen hepatocyten model uitwisselingen tussen cellen en hun omgeving minder goed aanwezig zijn vanwege de afwezigheid van de bloedstroom.

Daarom wordt het gebruik van primaire humane hepatocyten als meer geschikt geacht om *in vivo* toxiciteit te voorspellen bij de mens, maar wordt echter gehinderd door de grote variabiliteit tussen de donoren en de beperkte beschikbaarheid van donormateriaal (3, 4, 5). Ratten hepatocyten zijn een alternatief voor de menselijke hepatocyten en worden ook vaak gebruikt, maar een snelle daling in de leverspecifieke functies, met name cytochroom P450 (Cyp450) enzym activiteit, wordt waargenomen. Daarom kan een muizen *in vitro* hepatocyten systeem nog het beste alternatief zijn voor de menselijke situatie. Daarnaast zijn, aangezien de volledige sequentie van het muizen genoom bekend is (40) en transgene muizen modellen op grote schaal beschikbaar zijn, primaire muizen hepatocyten zijn beter geschikt zijn voor het verrichten van mechanistische onderzoeken van de lever toxiciteit.

Klasse voorspelling, beschreven in dit onderzoek, was gebaseerd op het gebruik van bepaalde model verbindingen en bleek tijdsafhankelijk te zijn. Daarom wordt aanbevolen om klasse voorspelling op basis van gen-expressie profielen op meer dan een tijdstip te bestuderen. Op basis van genexpressie-profielen werden 11 van de 12 (92%) verbin-

dingen juist ingedeeld. Om het systeem meer betrouwbaar te maken en om het aantal vals positieven te verminderen zou het onderzoek, beschreven in deze thesis, uitgebreid moeten worden door veel meer van deze verbindingen te gebruiken.

Klasse discriminatie bleek ook afhankelijk te zijn van de gebruikte classificatie methoden. Niet alle methoden resulteren in een juiste classificatie en dus moeten verschillende methoden worden toegepast om een optimale klasse discriminatie te verkrijgen.

## Conclusie

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift geeft aan dat het sandwich-gekweekte primaire muizen hepatocyten *in vitro* model weinig of geen inter-dier variatie heeft, relatief stabiel is en haar metabole bevoegdheid langer handhaaft dan ratten hepatocyten, terwijl het bijna gelijk in stabiliteit is met die van de humane hepatocyten. Op basis van onze genexpressie gegevens adviseren wij de toepassing van een herstel periode van 42 u alvorens de muizen hepatocyten bloot te stellen. Primaire muizen hepatocyten lijken ook in staat om BaP te metaboliseren, wat vorming van DNA-adducten en veranderingen in genexpressie-profielen veroorzaakt.

Dit onderzoek toont ook aan dat genexpressie-profielen, afkomstig van primaire muizen hepatocyten blootgesteld aan klassen van genotoxines, gebruikt kunnen worden voor klasse discriminatie. Een succesvolle indeling van de GTX en NGTX verbindingen kan verkregen worden met een verbetering in classificatie op langere blootstellingstermijn. Ook echte GTX carcinogenen kunnen met succes worden gediscrimineerd van vals-positieve GTX verbindingen door genexpressie-profilering. Hoewel deze discriminatie niet perfect is, kunnen de primaire muizen hepatocyten een nieuw *in vitro* systeem vertegenwoordigen dat de capaciteit heeft om verbindingen te profileren voor hun genotoxisch potentieel.

Dit onderzoek heeft dus een fundament gelegd voor de verdere ontwikkeling van een *in vitro* assay met primaire muizen hepatocyten door genexpressie-profilering te gebruiken om, als uiteindelijke doel, mogelijke kankerverwekkende stoffen te voorspellen. Dit model kan toegepast worden in de chemische veiligheid procedures aangezien zij de mogelijkheden hebben om gedetailleerde inzichten in het werkingsmechanisme van toxische stoffen te verstrekken. Door deze informatie te koppelen aan de parameters die in routine toxiciteit onderzocht worden (fenotypisch ankers), kan dit uiteindelijk leiden tot het gebruik van specifieke *in vitro* systemen die specifieke *in vivo* toxiciteit voorspellen.

## Referenties

1. Blaauboer, B.J., et al., The practical applicability of hepatocyte cultures in routine testing. EcVam workshop report 1, 1994.
2. Davila, J.C., et al., Predictive value of in vitro model systems in toxicology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1998. **38**: p. 63-96.
3. Schaeffner, I., et al., A microtiterplate-based screening assay to assess diverse effects on cytochrome P450 enzyme activities in primary rat hepatocytes by various compounds. *Assay Drug Dev Technol*, 2005. **3**(1): p. 27-38.
4. Richert, L., et al., Evaluation of the effect of culture configuration on morphology, survival time, antioxidant status and metabolic capacities of cultured rat hepatocytes. *Toxicol In Vitro*, 2002. **16**(1): p. 89-99.
5. Berry, M.N., et al., Isolated hepatocytes--past, present and future. *Cell Biol Toxicol*, 1997. **13**(4-5): p. 223-33.
6. Dambach, D.M., B.A. Andrews, and F. Moulin, New technologies and screening strategies for hepatotoxicity: use of in vitro models. *Toxicol Pathol*, 2005. **33**(1): p. 17-26.
7. Kirkland, D., et al., Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutat Res*, 2005. **584**(1-2): p. 1-256.
8. Hockley, S.L., et al., Time- and concentration-dependent changes in gene expression induced by benzo(a)pyrene in two human cell lines, MCF-7 and HepG2. *BMC Genomics*, 2006. **7**: p. 260.
9. Lambert, C.B., et al., Dose- and time-dependent effects of phenobarbital on gene expression profiling in human hepatoma HepaRG cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009. **234**(3): p. 345-60.
10. van Delft, J.H., et al., Discrimination of genotoxic from non-genotoxic carcinogens by gene expression profiling. *Carcinogenesis*, 2004. **25**(7): p. 1265-76.
11. Pillar, T.M. and H.J. Seitz, Oxidative stress response induced in rat primary hepatocyte monolayers by mechanical removal of adherent cells. *Cell Tissue Res*, 1999. **295**(2): p. 363-7.
12. Kienhuis, A.S., et al., A sandwich-cultured rat hepatocyte system with increased metabolic competence evaluated by gene expression profiling. *Toxicol In Vitro*, 2007. **21**(5): p. 892-901.
13. Boess, F., et al., Gene expression in two hepatic cell lines, cultured primary hepatocytes, and liver slices compared to the in vivo liver gene expression in rats: possible implications for toxicogenomics use of in vitro systems. *Toxicol Sci*, 2003. **73**(2): p. 386-402.
14. Rogiers, V. and A. Vercruysse, Rat hepatocyte cultures and co-cultures in biotransformation studies of xenobiotics. *Toxicology*, 1993. **82**(1-3): p. 193-208.
15. Kern, A., et al., Drug metabolism in hepatocyte sandwich cultures of rats and humans. *Biochem Pharmacol*, 1997. **54**(7): p. 761-72.
16. Bartek, J. and J. Lukas, DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol*, 2007. **19**(2): p. 238-45.
17. Wilkening, S., F. Stahl, and A. Bader, Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos*, 2003. **31**(8): p. 1035-42.
18. Wilkening, S. and A. Bader, Influence of culture time on the expression of drug-metabolizing enzymes in primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2. *J Biochem Mol Toxicol*, 2003. **17**(4): p. 207-13.
19. Levine, A.J., p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 1997. **88**(3): p. 323-31.
20. Adimoolam, S. and J.M. Ford, p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)*, 2003. **2**(9): p. 947-54.
21. van Delft, J.H., et al., Comparison of supervised clustering methods to discriminate genotoxic from non-genotoxic carcinogens by gene expression profiling. *Mutat Res*, 2005. **575**(1-2): p. 17-33.
22. Uehara, T., et al., A toxicogenomics approach for early assessment of potential non-genotoxic hepatocarcinogenicity of chemicals in rats. *Toxicology*, 2008. **250**(1): p. 15-26.

23. Tweats, D.J., et al., Determination of genetic toxicity and potential carcinogenicity in vitro--challenges post the Seventh Amendment to the European Cosmetics Directive. *Mutagenesis*, 2007. **22**(1): p. 5-13.
24. Thomas, R.S., et al., A comparison of transcriptomic and metabonomic technologies for identifying biomarkers predictive of two-year rodent cancer bioassays. *Toxicol Sci*, 2007. **96**(1): p. 40-6.
25. Nioi, P., et al., Prediction of non-genotoxic carcinogenesis in rats using changes in gene expression following acute dosing. *Chem Biol Interact*, 2008. **172**(3): p. 206-15.
26. Kirkland, D.J., et al., Testing strategies in mutagenicity and genetic toxicology: an appraisal of the guidelines of the European Scientific Committee for Cosmetics and Non-Food Products for the evaluation of hair dyes. *Mutat Res*, 2005. **588**(2): p. 88-105.
27. Iida, M., et al., Unique patterns of gene expression changes in liver after treatment of mice for 2 weeks with different known carcinogens and non-carcinogens. *Carcinogenesis*, 2005. **26**(3): p. 689-99.
28. Hu, T., et al., Identification of a gene expression profile that discriminates indirect-acting genotoxins from direct-acting genotoxins. *Mutat Res*, 2004. **549**(1-2): p. 5-27.
29. Eun, J.W., et al., Discriminating the molecular basis of hepatotoxicity using the large-scale characteristic molecular signatures of toxicants by expression profiling analysis. *Toxicology*, 2008. **249**(2-3): p. 176-83.
30. Ellinger-Ziegelbauer, H., et al., Comparison of the expression profiles induced by genotoxic and non-genotoxic carcinogens in rat liver. *Mutat Res*, 2005. **575**(1-2): p. 61-84.
31. Ellinger-Ziegelbauer, H., et al., Prediction of a carcinogenic potential of rat hepatocarcinogens using toxicogenomics analysis of short-term in vivo studies. *Mutat Res*, 2007.
32. Ellinger-Ziegelbauer, H., et al., Application of toxicogenomics to study mechanisms of genotoxicity and carcinogenicity. *Toxicol Lett*, 2009. **186**(1): p. 36-44.
33. da Silva, J., et al., Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food Chem Toxicol*, 2002. **40**(7): p. 941-7.
34. Aubrecht, J., et al., Molecular genotoxicity profiles of apoptosis-inducing vanadocene complexes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1999. **154**(3): p. 228-35.
35. Ashby, J., Use of short-term tests in determining the genotoxicity or nongenotoxicity of chemicals. *IARC Sci Publ*, 1992(116): p. 135-64.
36. Aubrecht, J. and E. Caba, Gene expression profile analysis: an emerging approach to investigate mechanisms of genotoxicity. *Pharmacogenomics*, 2005. **6**(4): p. 419-28.
37. Aardema, M.J. and J.T. MacGregor, Toxicology and genetic toxicology in the new era of "toxicogenomics": impact of "-omics" technologies. *Mutat Res*, 2002. **499**(1): p. 13-25.
38. LeCluyse, E.L., et al., Regulation of glutathione S-transferase enzymes in primary cultures of rat hepatocytes maintained under various matrix configurations. *Toxicol In Vitro*, 2000. **14**(2): p. 101-15.
39. LeCluyse, E.L., et al., Regeneration and maintenance of bile canalicular networks in collagen-sandwiched hepatocytes. *Toxicol In Vitro*, 2000. **14**(2): p. 117-32.
40. Waterston, R.H., et al., Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 2002. **420**(6915): p. 520-62.